

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Centre de transfusion, Hôpital cantonal

FACULTÉ DE MÉDECINE
Docteur R. FISCHER

Thèse dirigée par le docteur R. Martin-Du Pan, Privat-docent

**Le sort des gamma-globulines
marquées avec de l'iode radioactif injectées
par voie intraveineuse ou intramusculaire**

THÈSE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Bernard GHITMAN

de

New York (USA)

Thèse N° 2442

**Editions Médecine et Hygiène
GENÈVE
1957**

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Centre de transfusion, Hôpital cantonal

FACULTÉ DE MÉDECINE
Docteur R. FISCHER

Thèse dirigée par le docteur R. Martin-Du Pan, Privat-docent

**Le sort des gamma-globulines
marquées avec de l'iode radioactif injectées
par voie intraveineuse ou intramusculaire**

THÈSE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Bernard GHITMAN

de

New York (USA)

Thèse N° 2442



**Editions Médecine et Hygiène
GENÈVE
1957**

La Faculté de médecine, sur le préavis de Monsieur R. Fischer, chargé de cours, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 10 décembre 1956.

Le doyen :

Eric MARTIN

Thèse N° 2442

Nous tenons à remercier vivement Monsieur le docteur R. Fischer, Directeur du Centre de transfusion de l'Hôpital cantonal de Genève, et le Docteur P. Wenger, Directeur du Centre de radium de Genève, ainsi que le docteur J. Scheidegger.

Toute notre reconnaissance va également au docteur R. Martin-du Pan, qui a bien voulu inspirer et diriger cette thèse.

A NANE, ma femme et meilleure amie.

TABLE DES MATIERES

I	Introduction
II	Les protéines marquées avec des indicateurs radio-actifs
III	Recherches concernant le sort des gamma-globulines radio-actives injectées de façons diverses dans la circulation
IV	Discussion et conclusions
V	Résumé
VI	Bibliographie

I INTRODUCTION

L'emploi de protéines sériques marquées avec des substances radioactives a permis de réaliser ces dernières années, des progrès intéressants dans le domaine des protéines plasmatiques et des anticorps notamment.

A la suite des expériences de Terry et coll.¹, entre autres, il était connu que l'équilibre azoté de chiens soumis à une diète ne contenant pas de protéines pouvait être maintenu pendant plusieurs mois par l'administration de protéines plasmatiques homologues administrées de façon intra-veineuse. L'injection de protéines sériques marquées par des isotopes radioactifs a en outre démontré de façon convaincante que les protéines injectées quittent la circulation rapidement jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint avec la quantité de protéines plasmatiques extra-vasculaires, 5, 8, 9, 10. En d'autres termes, il existe un "équilibre dynamique" pour reprendre l'heureuse expression de Schoenheimer², entre les protéines plasmatiques injectées et celles présentes dans le plasma et dans l'espace extra-vasculaire. Ces protéines injectées quittent donc librement la circulation pour être en contact intime avec divers tissus. Il est évident que les notions classiques concernant les échanges de protéines entre la circulation et la "lymphe" sont à reconsidérer.

Un problème qui se rattache à cette question en partie, et dont l'importance clinique est considérable est de savoir si les gamma-globulines que l'on sait fabriquées ailleurs que les autres protides² suivent les mêmes lois que ces dernières. Dans ce travail, après de brèves discussions concernant les protéines plasmatiques marquées par des indicateurs radioactifs et la formation d'antigènes fluorescents, nous décrirons des expériences faites au moyen de gamma-globulines marquées injectées de diverses façons dans l'organisme humain.

Choix des indicateurs.

La plupart des chercheurs ayant étudié le métabolisme des protéines plasmatiques marquées ont utilisé des protéines biosynthétisées marquées avec du N^{15} , C^{14} ou S^{35} . Mais ainsi que le relève Myant ³, il est difficile sous ces conditions de mesurer le taux auquel l'indicateur est libéré, ce dernier pouvant être utilisé dans la synthèse de nouvelles molécules protidiques ou pouvant suivre d'autres sentiers métaboliques où il ne peut être identifié. Mais si la protéine est marquée par de l'iode radioactif, une dégradation de la protéine produit des fragments qui sont ou bien éliminés rapidement dans l'urine ou concentrés dans la thyroïde. Donc, la libération de l'iode radioactif peut être déduite en estimant la quantité accumulée dans la thyroïde et dans l'urine ainsi que par la faible quantité d'iode radioactif circulant en direction d'un de ces 2 endroits.

Myant ³, a utilisé des gamma-globulines marquées à l'iode par la méthode de Wormall et coll. ⁴. Cette dernière consiste en principe à laisser agir une solution de protéine dans un milieu faiblement alcalin contenant l'iode radioactif. Wasserman ⁵ a également utilisé des albumines marquées à l' I_{131} avec de bons résultats. Haurowitz ⁶ a employé une solution d'iodoalbumine contenant une petite quantité d'iode radioactif. L'auteur fait remarquer que cette substance est différente de l'ovalbumine- I_{131} ou de l'albumine- I_{131} quant à sa distribution dans l'organisme. Mais cet auteur étudiait surtout les fonctions antigéniques de ces protéines hétérologues.

Pour Dixon et coll. ⁷, l' I_{131} peut être ajoutée à presque toutes les protéines sans altérer leurs qualités immunologiques.

Taux de disparition des protéines marquées de la circulation.

Celles-ci disparaissent en deux phases bien distinctes:

- 1) Phase rapide, correspondant au temps nécessaire pour que l'équilibre se produise entre les protéines plasmatiques vasculaires et extravasculaires (plus le catabolisme de la protéine). Courbe exponentielle.
- 2) Phase lente due au catabolisme de la protéine uniquement.

La différence entre les 2 courbes représente la quantité de protéine passant dans l'espace extravasculaire.

Les temps de disparition varient quelque peu d'auteur en auteur; citons quelques chiffres:

Wassermann ⁵: l'albumine marquée injectée dans la jugulaire de chiens quitte rapidement la circulation.

Au bout de 1 H., la plasma ne contient que 91,5% de l'activité spécifique
" " " 3 " " " " " 86% " " "
" " " 5 " " " " " 80% " " "
" " " 24 " " " " " 45% " " "
" " " 72 " " " " " 32% " " "

Fink et coll. ⁸: chez des chiens, 50% de la protéine marquée était en circulation au bout de 24 heures, et 40% après 48 heures.

Cope et More ⁹: l'équilibre entre plasma et lymphes se produit entre 17 et 23 heures après l'injection d'albumine. D'après Wasserman ⁵, ces chiffres se situent entre 7 et 8 heures.

Dixon et coll. ⁷: avec des globulines homologues marquées à l'iode chez le lapin, il se produit une chute importante de l'activité spécifique (à 1/3 de la quantité injectée) au bout de 24 heures. Ce temps = temps d'équilibration. Avec des globulines hétérologues, on obtient les mêmes courbes que pour les globulines homologues. Au début, donc, l'organisme utilise la gamma-globuline étrangère exactement comme une globuline homologue.

D'après les travaux de Miller et coll. ¹⁰, il ressort en outre, que la fraction de globulines disparaît plus rapidement que l'albumine.

Espace extra-vasculaire.

La quantité de protéine présente en dehors de la circulation est considérable. Pour Miller ¹⁰, on pourrait l'appeler "protéine lymphatique", celle-ci étant en échange continu avec les protéines plasmatiques. Le terme de "protéine extra-vasculaire" correspondant à un espace du même nom semble toutefois préférable. Cet "espace" ne représente pas, bien entendu, un lieu anatomique défini mais plutôt la quantité de protéine en équilibre avec les protéines plasmatiques et serait contenue surtout dans la lymphe, dans le liquide interstitiel et dans le tissu conjonctif.

D'après Myant ³, le faible contenu en globuline de la

lymphe drainant les membres fait penser que la fuite de protéines s'effectue à certains endroits seulement. Les viscères abdominaux et le foie dans lesquels la lymphe a une forte quantité de protéine, sont peut-être les sites les plus probables où s'effectue l'échange entre le plasma et l'espace extra-vasculaire. Une dilution du "pool" protéinique pourrait se produire par une simple diffusion dans la lymphe et dans les liquides interstitiels, le retour à la circulation se faisant au moyen de l'afflux de lymphe dans les grandes veines. Myant note toutefois que ces expériences n'excluent pas la possibilité que les molécules de gamma-globulines marquées ayant pénétré dans le liquide interstitiel se mélangent en outre dans un réservoir intercellulaire.

D'après les expériences de ce dernier auteur effectuées avec de la gamma-globuline marquée à l' I_{131} , l'espace protéinique total dans l'organisme correspond à 5 l. de plasma environ. Pour Miller ¹⁰, la quantité de protéine extra-vasculaire est à peu près égale à la quantité de protéine plasmatique.

Des protéines plasmatiques spécifiques ont été trouvées dans le tissu conjonctif et dans les callules de plusieurs organes (Gitlin et Janeway ¹¹). Dans des cas présentant un taux anormalement bas d'une protéine spécifique du plasma chez l'homme: dans l'agammaglobulinémie (Janeway ¹² et coll.), dans l'afibrinogénémie (Gitlin et Borges ¹³), il a été démontré que les tissus extra-vasculaires ont également un contenu réduit de ces protéines spécifiques. Ces déficits extra-vasculaires sont réduits rapidement par l'administration intra-veineuse de ces protéines spécifiques. Gitlin et Janeway ¹¹ ont pu démontrer expérimentalement que le contraire est aussi vrai: un excès de protéines dans le système extra-vasculaire entraîne un passage de celles-ci dans la circulation, ce qui confirme à nouveau la notion d'un "équilibre dynamique" entre les protéines sanguines et extra-vasculaires.

Temps de disparition de la gamma-globuline:

Dans ce travail, c'est surtout le sort de la gamma-globuline injectée de façons diverses qui nous intéressera; ainsi, nous nous étendrons principalement sur les données récentes concernant la disparition de cette protéine de la circulation ou des tissus.

Nous avons déjà mentionné les travaux de Dixon et coll. ⁷ qui ont injecté par voie intra-veineuse des globulines homologues marquées à l'iode 131 chez le lapin. Après 24 heures, le sang ne contenait que le tiers de la quantité injectée. Cette chute représente le temps nécessaire pour que l'équilibre s'établisse entre les systèmes

protéiniques sanguins et extra-vasculaires. Les résultats de ces expériences indiquent qu'il existe deux fois plus de globulines dans le système extra-vasculaire que dans le plasma. Une fois l'équilibre atteint les globulines disparaissent à un taux régulier avec une demi-vie de deux jours. Cette phase correspond à la phase lente, celle du catabolisme de la protéine.

En injectant des gamma-globulines hétérologues marquées à l'I₁₃₁ à des lapins par voie intra-veineuse aussi, ces auteurs ont obtenu la même courbe de disparition que pour la globuline homologue. Au début, l'organisme utilise la gamma-globuline étrangère comme une globuline homologue, la protéine étrangère étant dans la circulation et entrant en contact intime avec les cellules diverses de l'organisme. Après le quatrième jour, le taux de disparition de la gamma-globuline augmente rapidement; ceci est dû à l'apparition d'anticorps. La protéine étrangère baisse rapidement dans le sang et dans les tissus, et est éliminée par les cellules phagocytaires, localisées surtout dans le système réticulo-endothélial, avec un catabolisme rapide. Il ne semble pas nécessaire qu'une adaptation cellulaire enzymatique se fasse dans ce catabolisme rapide de l'antigène.

Dans des études récentes sur les taux de disparition de globuline I₁₃₁ et d'albumine C₁₄, Mc Farlane ²⁷ a établi que les activités spécifiques des protéines plasmatiques diminuaient d'une façon exponentielle pendant la période de 3 à 26 jours. L'élimination (ou le remplacement) de l'albumine se fait au taux de 8,8% par jour, tandis que l'élimination (ou le remplacement) de la globuline se fait à un taux de 11,2% par jour. Des questions de technique ont été aussi revues dans ce travail et les courbes de disparition obtenues, comparées; ainsi, des protéines C₁₄ et I₁₃₁ dans lesquelles l'iodisation a été effectuée par des méthodes différentes, ont été étudiées. Ces travaux, ainsi que ceux de Cohn et coll. ²⁸ mettent en évidence une variation de $\pm 20\%$ pour les protéines I₁₃₁ et C₁₄, dépendant de la technique utilisée. Si l'on tient compte de ces variations, les globulines et albumines marquées au C₁₄ et I₁₃₁ se comportent à peu près de la même façon.

Les expériences effectuées par Myant ³ comportaient des injections intra-veineuses d'une solution de gamma-globulines marquées à l'I₁₃₁, contenant de 100 à 200 mg de protéine administrée à 12 patients. Les mesures ont été effectuées sur la radioactivité du plasma et sur l'accumulation d'iode radioactif dans la thyroïde et dans les urines. Des échantillons de sang ont été prélevés après 15 minutes, lorsque le mélange de la protéine dans le plasma était terminé, puis

après 1, 2, 4, 6, 20 et 24 heures. Par la suite, les prélèvements étaient pratiqués tous les jours jusqu'au 10^e jour. Le taux de disparition du plasma concordait avec les expériences précédentes, soit en deux phases, l'une rapide et l'autre lente. Dix jours après l'injection (les prélèvements n'ont pas été effectués à partir de cette période), la quantité présente dans le sang était de 20% environ de la quantité injectée. Il est toutefois possible de calculer la concentration présente après un nombre plus élevé de jours, le taux de disparition de la seconde phase étant approximativement linéaire par rapport au temps, si les valeurs sont inscrites sur une échelle semi-logarithmique. Le taux de disparition de la 1^{ère} phase faisant penser que la quantité de protéine extra-vasculaire était équivalente à environ 5 litres de plasma. La phase lente fournit des renseignements concernant le catabolisme de la protéine; le taux de catabolisme de la gamma-globuline représente une demi vie d'environ 8 jours.

Des renseignements additionnels concernant la gamma-globuline sont publiés par Lang et coll.²⁹, qui ont étudié le cas d'une personne de 29 ans présentant une agamma-globulinémie. Des expériences réalisées avec la gamma-globuline marquée à l'iode ¹³¹ injectée par voie intra-veineuse chez des patients, donnèrent des courbes comparables à celles obtenues par Myant, Lang ayant pourtant continué les prélèvements de sang pendant 30 jours. Au bout de 10 jours, la quantité de gamma-globuline plasmatique était de 20% de la quantité injectée, et, au bout de 20 jours, environ 10% était présente dans le plasma. Après 30 jours, il ne restait plus de protéine radioactive dans le sang.

De nouveaux éléments concernant le sort, la localisation et le catabolisme de la gamma-globuline ont été rapportés grâce à la méthode de Coons qui consiste à conjuguer des anticorps avec de la fluorescéine. Nous aborderons cette question dans le chapitre suivant.

LES ANTICORPS FLUORESCENTS

Cette méthode géniale développée principalement par Coons a donné des résultats tout à fait remarquables. Une solution d'anticorps à titre élevé est conjuguée avec de l'isocyanate de fluorescéine. Là où se produira une réaction anticorps-antigène, l'anticorps fluorescéine sera fixée; des protéines fluorescentes non fixées sont éliminées dans le lavage. Les coupes sont examinées au microscope fluorescent permettant de localiser l'anticorps au niveau cellulaire.

Ainsi, il a été démontré (Coons et Kaplan 14; Kaplan, Coons et Deane 15; Coons, Snyder 16; Coons 17; Gitlin, Landing et Whipple 8) que lorsque des substances étrangères telles que des polysaccharides bactériennes, des protéines animales sont injectées dans la veine d'une souris, ces substances disparaissent rapidement de la circulation et apparaissent dans le tissu conjonctif. Elles se trouvent en haute concentration dans les phagocytes de l'organisme. Elles sont présentes aussi, en moindre concentration, dans les lymphocytes des nodules spléniques et dans les ganglions lymphatiques. Les épithélia sont mieux protégés, mais ces substances étrangères pénètrent aussi dans le foie et dans les reins.

Une différence frappante existe entre le taux de disparition des antigènes (Coons 17): Chez la souris l'albumine d'oeuf disparaît de la circulation au bout de quelques heures; l'albumine bovine, au bout de quelques jours; la gamma-globuline humaine disparaît de la circulation en 1 semaine. Le taux de disparition de l'antigène est inversement proportionnel à la dimension moléculaire de l'antigène. Par contre, les antigènes polysaccharidiques provenant des pneumocoques II et III persistent pendant des semaines et même pendant des mois.

D'après les expériences de Gitlin, Landing et Whipple 18, les albumines plasmatiques, les gamma-globulines, les bêta-globulines, se localisent dans de nombreuses cellules et en particulier dans les noyaux, dans les tissus conjonctifs, dans les espaces interstitiels, dans les lymphatiques et dans les vaisseaux sanguins. Notons que le fibrinogène est absent dans les cellules, faisant penser que ces dernières n'assimilent pas cette protéine.

Cette vaste distribution de protéines plasmatiques dans des cellules et dans le tissu conjonctif met en évidence l'étendue de l'espace extra-vasculaire dont les protéines sont en équilibre avec le plasma en circulation.

Un fait intéressant est à relever: la localisation préférentielle des gamma-globulines dans les noyaux. Gitlin et coll. se demandent si la présence de ces anticorps nucléaires ne pourrait pas expliquer, du moins partiellement, la question d'immunité "tissulaire" par opposition à l'immunité "humorale".

RADIOACTIVES INJECTÉES DE FAÇON DIVERSES

La majorité des travaux que nous venons de résumer, traite du passage de protides homologues ou hétérologues injectées par voie intra-veineuse chez des animaux, dans les espaces extra-vasculaires.

Or, dans la pratique clinique courante, l'injection intra-veineuse de gamma-globuline paraissait délicate. Ainsi, Janeway³⁰ a signalé que des enfants présentant une rougeole ou une scarlatine à la période d'état, et chez qui des injections de gamma-globuline par voie intra-veineuse avaient été faites, réagirent d'une façon alarmante. "L'enfant devient brusquement agité et anxieux, commence à tousser et présente un faciès congestif; puis, en l'espace de quelques secondes, il redevient pâle; à ce stade, le pouls est lent et irrégulier, la pression difficile à prendre et l'enfant peut présenter de l'obnubilation. Cet épisode ne dure en général qu'une à deux minutes (l'injection ayant été immédiatement arrêtée). Dans les 20 minutes qui suivent apparaissent des frissons et une rapide élévation thermique de 1 à 2° C. Ce type de réaction a été observé chez 12 enfants atteints de rougeole ou de scarlatine". Il a été possible de mettre en évidence une action dépressive dans certaines préparations de gamma-globulines, malgré toutes les précautions qui ont été prises. En outre, l'enfant malade s'est montré plus sensible que les animaux du laboratoire à l'action dépressive des préparations de gamma-globulines. Janeway a terminé son exposé en signalant qu'aux Etats-Unis, les flacons de gamma-globuline portent la mention "Pas par voie intra-veineuse".

Commentant la déclaration de Janeway, Ellis³¹ a émis l'hypothèse qu'il se peut qu'une action anaphylactique intervienne dans ces réactions vis-à-vis de l'injection intra-veineuse de la protéine. Quoiqu'il en soit, le problème n'est pas encore tout-à-fait éclairci.

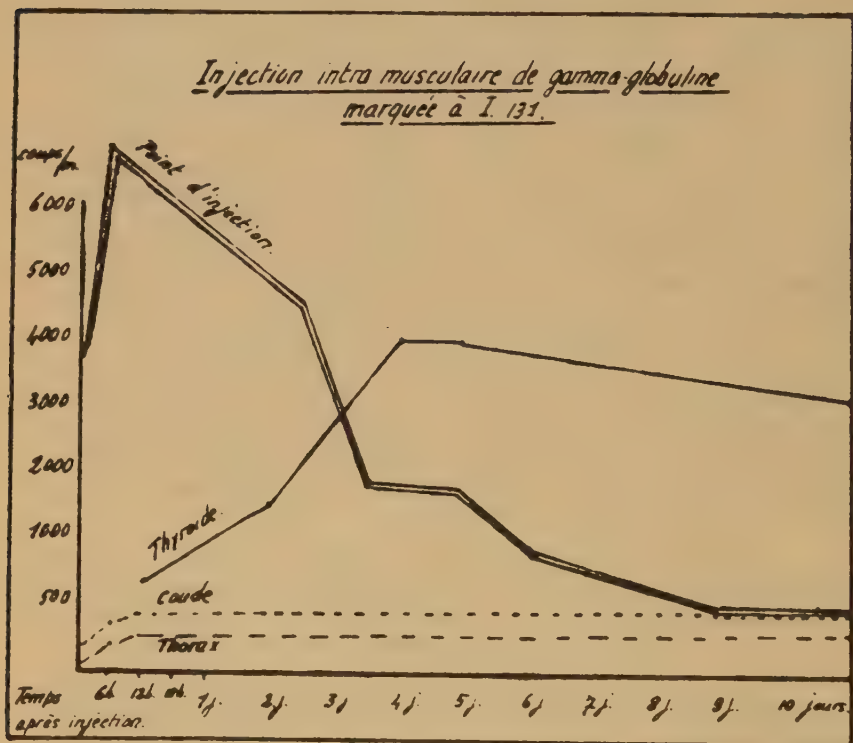
Ces faits ont motivé une certaine prudence dans l'injection intra-veineuse de la gamma-globuline, cette dernière ayant été au début injectée par voie intra-musculaire dans les expériences que nous décrivons.

Ces recherches ont été réalisées par Martin-du-Pan²⁰; elles comportaient 3 séries d'expériences:

- 1) Injection de gamma-globuline radioactive par voie intra-musculaire.
- 2) Injection de gamma-globuline radioactive par voie para-veineuse

3) Injection de gamma-globuline radioactive par voie intra-veineuse.

Une remarque s'impose ici. L'emploi de l'iode radioactif en tant qu'indicateur présente de gros avantages. En effet, l' I_{131} libéré de la molécule se fixe électivement dans la thyroïde ou est éliminé dans les urines en sorte que les calculs de la radioactivité sanguine ne sont pas faussés par la présence de l' I_{131} libre dans le sang. D'autre part, l' I_{131} s'éliminant rapidement de l'organisme n'est pas dangereux. Les milliers d'expériences faites pour étudier le fonctionnement de la Thyroïde en font foi.



1) Injection intra-musculaire.

La gamma-globuline marquée à l' I_{131} a été injectée de façon intra-musculaire à une femme enceinte. Cette gamma-globuline radioactive a été aimablement fournie par le Prof. de Visscher de L'Université de Louvain. (Fig. I).

Résultats: La gamma-globuline injectée passe bien dans la circulation, mais lentement, car, six jours après l'injection, le compteur de Geiger enregistrait encore 2 fois plus de battements au point d'injection que dans les autres régions du corps.

Dès le premier jour après l'injection, l'activité spécifique au point d'injection a déjà bien diminué, mais cette baisse est lente. On note qu'à part une certaine accélération dans la disparition, le 3ème jour, la baisse de radioactivité au point d'injection se fait assez régulièrement. En répétant l'expérience sur plusieurs sujets, on pourra s'attendre à trouver une ligne droite. Ce n'est que vers le 9ème jour, que l'activité spécifique locale est comparable à celle des autres tissus.

La concentration de la globuline radioactive dans le sérum maternel et dans le sang du cordon était très faible.

2) Injection intra et para-veineuse:

Méthode:

Cette expérience a été réalisée sur l'auteur. Injection de 10 cc intra-veineuse d'une solution de gamma-globuline marquée à l'I₁₃₁ préparée par l'Institut de radium de Genève. L'interne expérimenté qui a pratiqué cette injection avait bien l'impression que la solution était injectée dans la veine; toutefois, trois heures plus tard, le compteur de Geiger enregistrait de nombreux battements au lieu de l'injection, en sorte que cette dernière n'était certainement pas intra-veineuse. En outre, une légère infiltration locale s'est produite, mais quelques heures après l'injection seulement. Aucune douleur n'a été ressentie au moment de l'injection, mais seulement une heure après, remontant à une certaine distance le long de la veine. Il s'agit donc d'une injection dans la gaine de la veine. (Une injection en dehors de la veine aurait produit une infiltration douloureuse immédiate).

Résultats : (tableau I)

Après 3 heures, la concentration sanguine de protéine radioactive est bien moindre que chez les sujets ayant eu une injection intra-veineuse (voir plus loin). Il est à noter, qu'une fois fixée dans la rate, les reins et le foie, le taux de gamma-globuline marquée reste constant dans les organes. La gamma-globuline injectée dans les tissus para-veineux s'est résorbée lentement, pour disparaître presque complètement du point d'injection après 7 jours.

Au fur et à mesure que la protéine est résorbée, le taux sanguin augmente. L'accroissement de la radioactivité au niveau de

TABLEAU I

Injection intra et para-veineuse de 75 milli-curies de gamma-globuline marquée I₁₃₁ à un sujet de 27 ans
 Injection de 1 milli-curie / Kg de poids (poids du sujet: 75 kg.)

Temps après injection	THYROÏDE		lieu d' injection μC	MAIN μC	REIN μC	FOIE μC	RATE μC	VESSIE μC	URINE μC	SANG 100cc μC
	15cm μC	contact μC								
3 h.	0,0008	0,009	0,035	0,00035	0	-	-	-		0,020
6 h.	0,0011	0,0122	0,030	0,00035	0	0,0005	0,0005	0,00025	0,005 400cc	0,050
9 h.	0,0015	0,0125	0,028		0				0,007 850cc	0,116
24 h.	0,0010	0,016	0,016		0,00025				0,002 450cc	0,118
2 j.	0,0012	0,017	0,008		0,00035					0,100
3 j.	0,0008	0,015	0,003							
5 j.	0,0006	0,0053	0,0009							
7 j.	0,0007	0,009	0,00002							

la thyroïde est un indice de la fixation d'I₁₃₁ libre dans cette glande.

3) Injections intra-veineuses:

Cette série d'investigations avait été réalisée avant l'expérience 2.

L'injection intra-veineuse de gamme-globuline radioactive a été effectuée par d'autres auteurs chez des adultes sans effets nocifs (alors que chez des enfants malades, elle pourrait être dangereuse). La majorité des travaux pratiqués chez l'homme concerne l'injection d'albumine par voie intra-veineuse; or nous possédons peu de renseignements au sujet du taux de la protéine marquée dans un tissu. Afin de déterminer le taux de gamma-globuline passant à travers le placenta, Martin-Du-Pan a injecté des protéines marquées à des femmes enceintes.

Méthode:

La gamma-globuline a été marquée à l'I₁₃₁ à l'Institut de radium de Genève. Son innocuité a été contrôlée en l'injectant par voie intra-veineuse à des lapins. La spécificité de la solution a été déterminée au moyen de l'immuno-électrophorèse (voir plus loin).

Injection à 4 femmes enceintes, quelques heures avant l'accouchement, d'une solution de gamma-globuline contenant de 75 à 220 micro-curies d'I₁₃₁. La teneur en I₁₃₁ fixé à la gamma-globuline fut déterminée après l'accouchement dans le sang maternel, dans le placenta et dans le sang du cordon. Afin d'éliminer toute trace d'iode libre, le sérum fut dialysé et l'on calcula la teneur en sang du placenta pour en décompter la gamma-globuline sanguine. Le tableau II est emprunté au travail de Martin-Du-Pan et montre la répartition de la protéine dans les tissus et dans le placenta.

Résultats: (tableau II)

La quantité élevée de la gamma-globuline dans le placenta et dans le sang du cordon est frappante en comparaison avec la concentration de la protéine dans les autres tissus.

Les diverses concentrations de la protéine marquée sont indiquées dans la fi. 2.

On peut déduire de ces expériences que:

a) La gamma-globuline injectée par voie intra-veineuse ne quitte que lentement la circulation, puisque, 48 h. après l'injection, le sang contient environ 20 fois plus de radioactivité que dans

le reste de l'organisme.

b) La gamma-globuline injectée dans la circulation maternelle semble passer plus facilement dans le tissu placentaire que dans les autres tissus, puisqu'on en trouve entre 3 et 6 fois plus dans le placenta que dans le reste de l'organisme.

Les déterminations de radioactivité dans le sang du cordon ont démontré en plus que la gamma-globuline injectée dans le sang de la mère passe rapidement dans celui du fœtus, puisqu'on l'y retrouve déjà 2 heures après l'injection.

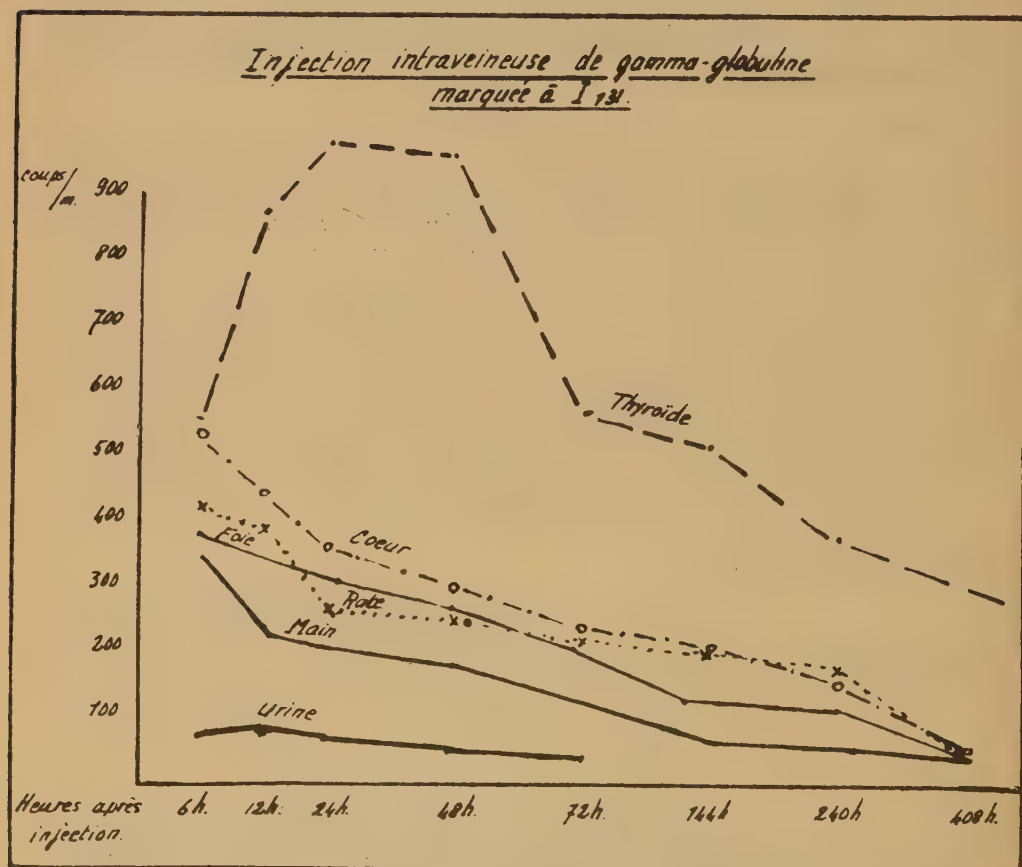


TABLEAU II

Injection intra-veineuse de gamma-globuline marquée au I_{131}

Sujet	Injection heures avant l'accou- chement	Dose injectée en micro- curies	Dose injectée de I_{131} en mi- cro-curies par Kg. de poids	Teneur de I_{131} dans 100 cc. de sang maternel	Teneur de I_{131} dans 100 gr. de tissu	Teneur de I_{131} dans 100 cc. de sang du cordon	Teneur en I_{131} dans 100 gr. de tissu placentaire
Mme A. 27 ans 60 Kg.	11	75	1,25	0,99	0,03	0,31	0,36
Mme B. 25 ans 55 Kg.	24	150	2,70	1,75	0,06	0,42	0,42
Mme C. 39 ans 60 Kg. Césarienne	48	220	3,70	3,0	0,065	0,57	0,35
Mme D. 29 ans 55 Kg.	2	80	1,4	1,55	0,025	0,20	-

IV DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il ressort de l'étude de la littérature que la gamma-globuline homologue injectée par voie intra-veineuse disparaît de la circulation de la même façon que l'albumine homologue, soit en deux phases:

- a) phase rapide, dans laquelle la protéine entre en équilibre avec le système protéinique extra-vasculaire;
- b) phase lente, représentant le taux de catabolisme de la protéine.

La première phase fournit des renseignements concernant la quantité de protéines dans le système extra-vasculaire, le taux de la disparition de la protéine injectée moins le taux de catabolisme de cette dernière étant inversement proportionnel à l'importance du système extra-vasculaire. D'après Myant ³, ce dernier serait équivalent à 5 litres de plasma à peu près (pour la gamma-globuline); les expériences de Dixon ⁷ mettent en évidence un "pool" extra-vasculaire de gamma-globuline d'environ deux fois celui du plasma.

La deuxième phase indique le taux de catabolisme de la protéine. D'après Mc Farlane ²⁷, l'élimination (ou le remplacement) de l'albumine se fait à un taux de 8,8% par jour, tandis que l'élimination (ou le remplacement) de la globuline se fait à un taux de 11,2% par jour. La quantité de protéine injectée diminue de façon exponentielle pendant la période de 3 à 26 jours. Au moyen d'une échelle semi-logarithmique, il est donc possible de prévoir le taux de disparition. Les expériences de Myant, Lang et Mc Farlane concordent avec les nôtres. Dix jours après l'injection, la quantité de gamma-globuline présente dans le sang est de 20% de la quantité injectée. Au bout de 20 jours, la quantité présente dans le sang est d'environ 10%. La disparition totale de la protéine se produit vers le 30ème jour.

Des gamma-globulines hétérologues injectées par voie intra-veineuse disparaissent de la circulation au début, de la même façon que les protéines homologues. Après le 4ème jour toutefois, le taux de disparition de la gamma-globuline étrangère augmente rapidement à cause de la production d'anticorps avec fixation de l'antigène dans les cellules réticulo-endothéliales.

L'injection intra-veineuse de gamma-globuline homologues radioactives, dûment préparées et contrôlées, paraît sans danger chez les adultes, pourvu qu'elle soit injectée lentement. Cependant,

l'injection intra-veineuse de ces substances chez des enfants malades est déconseillée à la suite des expériences de Janeway ³⁰ qui ont mis en évidence une substance dépressive même dans les préparations les plus soignées et pour laquelle les enfants malades (atteints de rougeole ou de scarlatine par exemple) semblent particulièrement sensibles.

L'injection intra-musculaire de gamma-globuline radio-active.

L'expérience a démontré que la gamma-globuline injectée dans la musculature passe dans la circulation, mais le passage est lent. Pour pouvoir constater une disparition selon une courbe linéaire, il faudrait évidemment répéter l'expérience sur plusieurs sujets.

Injection de gamma-globuline par voie intra et para-veineuse.

Cette expérience a été intéressante car elle a permis de démontrer que l'injection a été faite dans la gaine de la veine. Là aussi, la présence de la gamma-globuline a pu être mise en évidence dans le sang 3 heures après l'injection, quoique naturellement sa concentration était faible au début. Le taux sanguin de gamma-globuline augmentait au fur et à mesure que la résorption locale progressait, atteignant un maximum après 24 heures pour décroître ensuite 7 jours après l'injection. Ceci diffère donc de l'injection intra-musculaire après laquelle, au 9ème jour encore, on trouvait une certaine radioactivité au niveau de l'injection. Mais le taux sanguin n'atteignait jamais un niveau important, ce qui était dû, probablement aux échanges entre les protéines intra et extra-vasculaires, fait démontré par les auteurs cités plus haut. On pourrait supposer que la phase rapide de la disparition de protéines marquées du sang nous aurait empêché d'atteindre un taux élevé de protéines dans le sang.

A noter les taux constants de gamma-globuline dans les reins, le foie et la rate à partir de 6 heures après l'injection.

Il est intéressant de remarquer l'absence de douleur au moment de l'injection, ainsi que dans l'heure suivante. Pourrait-on supposer que certaines substances considérées comme nuisibles pour la veine ne le soient pas, mais que ce soit plutôt une lésion faite par l'aiguille qui provoque les troubles. Si la substance injectée ne causait pas de douleur immédiate, même donnée dans la gaine de la veine, on penserait donc à tort cette substance responsable des ennuis.

Injection de gamma-globuline par voie intra-veineuse.

Cette série d'investigations est d'un grand intérêt,

car elle a été réalisée chez des femmes enceintes, en sorte que le passage de la gamma-globuline a pu être déterminé entre autres, dans le placenta et dans le cordon ombilical.²⁰.

Rappelons que Martin-Du-Pan et coll.¹⁹ avaient démontré, il y a quelques années, au moyen de l'électrophorèse, que le sérum du nouveau-né contenait de fortes quantités de gamma-globuline et l'hypothèse avait été émise que les gamma-globulines étaient d'origine maternelle et qu'elles arrivaient à franchir la barrière placentaire.

Nous pouvons tirer d'autres conclusions encore de ce travail sur les femmes enceintes. Le tableau II démontre que le placenta possède une affinité bien plus élevée pour la gamma-globuline que les autres tissus. On pourrait même, peut-être, en plus du terme "perméabilité sélective" qu'utilise Martin-Du-Pan, parler d'affinité sélective.

Ces études ont pu être complétées par deux méthodes que nous allons décrire:

1) Les anticorps fluorescents:

Cette méthode a déjà été décrite dans ce travail. Martin-Du-Pan a essayé de mettre en évidence les gamma-globulines marquées à l'iode radioactif par l'autophotographie. Cependant, les concentrations de la substance radioactive n'étaient pas suffisantes pour obtenir de bonnes images, en sorte que l'auteur s'est adressé à la méthode de Coons.

Du sérum anti-gamma-globuline a été rendu fluorescent par l'adjonction d'isocyanate de fluoresceine. Après un contrôle de sa spécificité par l'immuno-électrophorèse, une goutte de solution a été versée sur une coupe de placenta congelé immédiatement après son expulsion. L'examen histologique mit en évidence la présence de gamma-globuline dans l'axe conjonctif des villosités choriales et dans le syncytiotrophoblaste. Rappelons que Gitlin et coll.¹⁸ décelèrent par la même méthode la gamma-globuline dans le tissu conjonctif, dans les espaces interstitiels, dans les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques et en particulier dans les noyaux.

2) L'immuno-électrophorèse:

La méthode consiste en une électrophorèse sur gélose d'une solution d'antigènes avec une précipitation spécifique au moyen d'un immunsérum. Cette technique a été développée récemment par Grabar et Williams et a permis à Scheidegger et coll.²⁵ de démontrer (à partir d'échantillons de séra, d'embryons humains prélevés à l'occasion d'interruption de grossesses pour des raisons médicales) que les gamma-

globulines n'apparaissent que dès la 12^{ème} semaine de la vie embryonnaire. Or, c'est durant le 3^{ème} mois que le placenta commence à devenir perméable.

D'après cette technique, on obtient une différenciation beaucoup plus fine des protéines plasmatiques que par l'électrophorèse simple.

Cette méthode nous a été d'une grande utilité dans les expériences décrites plus haut. En effet, elle nous permet d'être certains que:

- 1) la protéine que nous utilisons n'est pas dénaturée, et
- 2) que l'iode radioactif est réellement lié à la protéine et non simplement en solution avec elle. On se rend compte de ceci par le fait que le dessin électrophorétique de la *gamma*-globuline montre de la radioactivité.

V RESUME

Nous avons brièvement passé en revue la littérature concernant les protéines marquées, le sort des gamma-globulines injectées dans la circulation et la localisation des antigènes au moyen des anticorps fluorescents.

Ce travail décrit en outre des expériences effectuées avec de la gamma-globuline marquée à l'iode radioactif et injecté de façon intra-musculaire, para-veineuse et intra-veineuse, et les résultats acquis.

VI BIBLIOGRAPHIE

1. TERRY, R., SANDROCK, W.E., NYE, R.E. et WHIPPLE, G.H. Parenteral. Plasma Protein Maintains Nitrogen Equilibrium over long Periods. J. exp. med. 1948, 87, 547.
2. SCHOENHEIMER, R. The Dynamic State of Body Constituents. Harward University Press, 1949.
3. MYANT, N.B. Observation on the Metabolism of Human Gamma-Globulin Labelled. by Radioactive Iodine. Clin. Science 1952, 11, 191.
4. FRANCIS et coll. Nature 1951, 167, 748.
5. WASSERMANN, K. et MAYERSON, H.S. Exchange of Albumin between Plasma and Lymph. Am. J. Physiol. 1951, 165, 15.
6. HAUROWITZ, F. et CRAMPTON, C.F. The Fate in Rabbits of Intravenously Injected I₁₃₁ - Iodoovalbumin. J. Immunol. 1952, 68, 73.
7. DIXON, F.J., BUKANTZ, S.C., DAMMIN, G.J. et TALMAGE D.W. Fate of I₁₃₁ Labelled Bovine Gamma Globulin in Rabbits. Federat-Proc. 1951, 10, 553.
8. FINK, R.M., ENNS, L.P., KIMBALL, H.E., SILBERSTEIN, W.F., BALE, S.C. MADDEN et WHIPPLE, G.H. J. exp. med. 1944, 80, 455.
9. COPE, O. et MORE, F.D. J. Clin. Investig. 1944, 23, 241.
10. MILLER, L.L., BALE, W.P., YUILE, C.L., MASTERS, R.E., TISCHKOFF, G.H. et WIPPLE, G.H. The Use of Radioactive Lysine in Studies of Protein Metabolism. J. exp. med. 1950, 90, 297.
11. GITLIN, D. et JANEWAY, C.A. The Dynamic Equilibrium between Circulating and Extravascular Plasma Proteins. Science 1953, 118, 301.
12. JANEWAY, C.A. En préparation. Cité dans (11).
13. GITLIN, D. et BORGES, W.H. Parafra dans Blood. Cité dans (11).
14. COONS, A.H. et KAPLAN, M.H. Localization of Antigen in Tissue Cells. J. exp. med. 1950, 91, 1.
15. KAPLAN, M.H., COONS, A.H. et DEANE, H.W. Localization of Antigen in Tissue Cells. Cellular Distribution of Pneumococcal Polysaccharides. J. exp. med. 1950, 91, 15.

16. COONS, A.H., SNYDER, J.C., CHEEVER, S.F. et MURRAY, E.S. Localization of Antigen in Tissue Cells. Antigens of Rickettsia and Mumps Virus. J. exp. med. 1951, 91, 31.
17. COONS, A.H. Fluorescent Antibodies as Histochemical Tools. Fed. Proc. 1951, 10, 558.
18. GITLIN, D., LANDING, B. et WIPPLE, A. The Localization of Homologous Proteins in the Tissues of Young Human Beings as Demonstrated with Fluorescent Antibodies. J. exp. med. 1953, 97, 163.
19. MOORE, D.H., MARTIN-DU-PAN, R. et BUXTON, C.C. Am. J. Obst. Gynec. 1949, 57, 312.
20. MARTIN-DU-PAN, R. Le passage de la gamma-globuline à travers le placenta. Journées des prématurés Paris Sept. 1956.
21. ANSELMINO, J.F. Über die Permeabilität der Placenta. Arch. f. Gynäk., 1929, 137: 724.
22. NEEDHAM, J. Chemical Embryology. Cambridge University Press, 1931, 3: Section 21.
23. ASCOLI, A. Passiert Eiweiß die placentare Scheidewand ?. Ztschr. f. Physiol. Chem., 1902, 36, 498.
24. GSELL, O. Zbl. Gynäk. 1950, 72, 1827.
25. SCHEIDEGGER, J.J., MARTIN, E. et RIOTTON, G. L'apparition des diverses composantes antigéniques du sérum au cours du développement foetal. J. Suisse de Méd. 1956, 86, 224.
26. MILLER, L., BLY, C.G. and BALE, W. Plasma and Tissue Proteins Produced by non-Hepatic Rat Organs as Studied with Lysine-C₁₄. J. Exp. Med. 1954, 99, 133.
27. Mc FARLANE, A.S. Labelling of Plasma Proteins with Radioactive Iodine. Biochem. J. 62, 135, 1956.
28. COHN, S., HOLLOWAY, R.C., MATTHEWS, C. and Mc FARLANE A.S. Behaviour of C₁₄ and I₁₃₁ proteins Injected into Rabbits. Biochem. J. 62, 143, 1956.
29. LANG, N., SCHETTLER, G. und WILDHACK, R. Über Einen Fall Von "Agammaglobulinämie" und Dans Verhalten Parenteral Zugeführten Radioaktiv Markierten Gammaglobulins Im Serum.

30. JANEWAY, C.A. Communication dans Centre International de l'enfance
-Travaux et Documents- IX Paris, 1955.
31. ELLIS Idem.
32. MARTIN, E., SCHEIDEGGER, J.J., GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A.
L'Analyse Immuno-électrophorétique du Sérum Humain
Normal. Bull. Acad. Suisse Sc. Med., 10, 193, 1954.

